

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยแบ่งออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. การพัฒนาโมเดลสัตว์ทดลองโดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนในสัตว์ทดลอง
2. การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ (T cells) ต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)
3. การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV เพื่อเป็นแนวทางพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น
 - 3.1. การเตรียมแอนติเจนจำเพาะต่อไวรัสเปปิโลมาชนิดโปรตีนบริสุทธิ์
 - 3.2. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีแอนติเจนของไวรัสเปปิโลมา
4. การพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

วัสดุและวิธีการ

1. เซลล์มะเร็งปากมดลูก

เซลล์ HeLa, Caski, และ SiHa ทั้งหมดเป็นเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสเปปิโลมา โดย HeLa มีการติดเชื้อของไวรัสเปปิโลมาชนิด 18 Caski (ATCC :CRL-1550 Lot No: 3794357) และ SiHa (ATCC: HTB-35 Lot No: 4031219) เป็นเซลล์ที่มีการติดเชื้อของไวรัสเปปิโลมาชนิด 16 เซลล์ทั้งสามชนิดนี้มีสารพันธุกรรมของไวรัสสอดแทรกอยู่และสามารถทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองได้อย่างต่อเนื่อง โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (MEM) ที่มีสารอาหารและยาปฏิชีวนะ ต่าง ๆ ผสมอยู่ เช่น 10% fetal bovine serum (FBS), 2 uM L-Glutamine, 10 mM HEPES, streptomycin (100 mg/ml) และ penicillin (100 unit/ml) เป็นต้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์

2. เซลล์ปากมดลูกปกติของคน

เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และจำเป็นต้องทำการตัดชิ้นเนื้อเพื่อการวินิจฉัยโรคว่าเป็นมะเร็งปากมดลูกหรือเพื่อการรักษาผ่าตัดเนื้อออก การเก็บตัวอย่างทำโดยสูตินรีแพทย์ ที่ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นำเนื้อเยื่อปากมดลูกของผู้ป่วยที่ได้จากการผ่าตัด แช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM

F12 (GIBCO) ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บจะรีบนำมาทำการย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวๆ ทันที โดยทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กราวประมาณ 1 ตารางมิลลิเมตร แล้วนำไปปั่นล้างใน Hank's Balanced Salt solution (HBSS) 2 ครั้ง แล้วนำไป incubate ใน digestion solution (1X DMEM F 12, 10% FBS, 5,000u/ml of penicillin, 5,000 ug/ml of streptomycin, 50u/ml of collagenase) 37 °C ซ้ำมคิน หลังจากนั้น นำเซลล์ที่ได้มาทำการปั่นล้าง ด้วย HBSS จำนวน 3 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM F12 ที่ประกอบด้วย 10% FBS, penicillin 5,000 u/ml, streptomycin 5,000 ug/ml, epidermal growth factor 10ng/ml, hydrocortisone 0.4ug/ml หลังจากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในหลอดทดลอง เมื่อเซลล์เริ่มเติบโต ทำการแยกเฉพาะส่วนที่เป็นเซลล์เนื้อเยื่อปกติ ให้บริสุทธิ์อีกครั้ง เซลล์ที่แยกได้นี้ให้ชื่อว่า NTY ซึ่งเซลล์ปากมดลูกปกตินี้ใช้เป็นเซลล์ควบคุมตลอดการศึกษาครั้งนี้

3. การตรวจหาสารพันธุกรรม HPV

ตัวอย่างเซลล์มะเร็ง นำมาทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Qiagen DNA mini kit แล้วทำการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HPV โดยเทคนิค PCR ด้วย primer L1 (18) ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของ HPV ได้อย่างน้อย 11 ชนิด คือ (HPV 6, 11,16, 18, 31, 33, 42, 52, 58, 34 และ 36) โดยลำดับเบสของ primers และ conditions ที่ใช้ในการทำ PCR แสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ oligo nucleotides ที่ใช้ในการศึกษา

Name	Sequence (5'- 3')	Target
L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT	HPV-L1
L1C2	TACCCTAAATACTCTGTATTG	HPV-L1
PC04	CAACTTCATCCACGTTCCACC	Human β - goblin
GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	Human β - goblin
GAPDH1	CAGTTGTGGTGGTGTCTTCC	Mouse GAPDH
GAPDH2	CTTGGAGGCCAAAAGAGAAG	Mouse GAPDH

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบและ condition ที่ใช้ในการทำ PCR ของแต่ละ primers

Primer	reaction (50ul)	condition	product size
L1C1 L1C2	1X buffer (100 mM.KCl, 20 mM Tris.) 1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 25 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 95 ° C 10 min 1 cycle Denature 95 ° C 1.30 min Annealing 40 ° C 1.30 min Extension 72 ° C 2 min Extension 72 ° C 10 min	40 250 bps.
PC04 GH20	1X buffer (100 mM.KCl, 20 mM Tris.) 1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 2.5 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 94 ° C 10 min 1 cycle Denature 94 ° C 30 sec Annealing 62 ° C 1min Extension 68 ° C 1 min Extension 68 ° C 1 min	40 268 bps
GAPD H1 GAPD H2	1.5 mM MgCl ₂ 200 uM dNTPs 25 pmole primers 1.25 units of Taq 1 ul of DNA sample	Start 94 ° C 10 min 1 cycle Denature 94 ° C 30 sec Annealing 62 ° C 1min Extension 68 ° C 1 min Extension 68 ° C 1 min	40

4. การจำแนกไทป์ HPV

ทำการจำแนกชนิดของ HPV ด้วยชุดทดสอบ HPV genotyping kit (INNO-LiPA HPV genotyping V2; Innogenetics) ซึ่งเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูปสามารถทำการจำแนกชนิดของ HPV ครอบคลุม 26 ชนิด โดยขั้นตอนการทดสอบจะปฏิบัติตามคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ ซึ่งชุดตรวจสอบใช้หลักการ ของ reverse hybridization โดยสารพันธุกรรมของ HPV ในบางส่วนของบริเวณ L1 ที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธี PCR จะถูกติดฉลากด้วย biotin หลังจากนั้นจะถูกทำให้เสียสภาพแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว แล้วนำไปทำการ hybridize กับ specific probes ที่จำเพาะต่อ HPV แต่ละชนิดที่ถูกตรึงเป็นแถวอยู่บนแผ่นเมมเบรน หลังจากนั้นจะทำการตรวจสอบสารพันธุกรรมที่สามารถจับกับ probes ได้โดยการเติม streptavidin ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase ตามด้วย substrate ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ จะเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิดสีม่วงบริเวณตำแหน่งที่สารพันธุกรรมของ HPV จับกับ specific probes นั้น ทำให้ทราบว่าเป็น HPV ชนิดใด

5. สัตว์ทดลอง

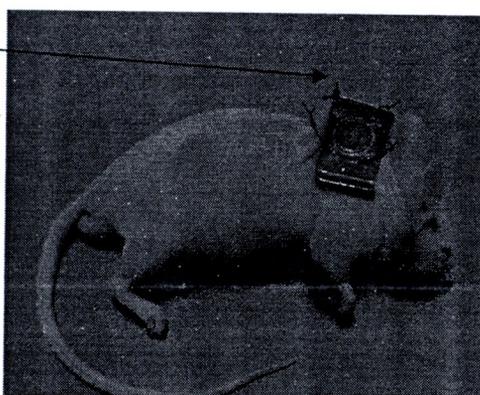
หนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c-nude mice อายุ 8-10 อาทิตย์ น้ำหนักประมาณ 20-25 กรัม สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล หนูทดลองจะทำการเลี้ยงภายในห้องควบคุมเชื้อ และอุณหภูมิ ที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มีการดูแลให้อาหารและน้ำตามแนวทางปฏิบัติของ Home office guidelines on the scientific use of animal (Scientific procedures) Act 1986

6. การปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

ในวันที่ทำการทดลอง หนูแต่ละตัวจะถูกทำให้สลบโดย Phentobarbital sodium 5-9 mg/100 g ทางช่องท้อง (IP) แล้วใส่ Dorsal- Skinfold Chamber บนหลัง (ดังรูปที่ 1) โดยจะทดลองใช้เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดของไวรัสเปปโตมาในปริมาณเซลล์ที่ต่างกัน (แปดแสน-สองล้านเซลล์) [11] ใส่ลงใน Dorsal- Skinfold Chamber จึงทำการปิด Chamber โดยใช้กระจกเพื่อป้องกัน ให้อยู่บริเวณนั้น ภายใน Chamber และจะใช้หนูไม่น้อยกว่า 5 ตัว สำหรับแต่ละกลุ่ม

รูปที่ 1

Dorsal- Skinfold Chamber
เซลล์มะเร็งที่ทราบชนิดจะนำ
ปลูกลงใน Chamber



7. การศึกษาเพื่อยืนยันการเจริญของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง

1. การตรวจทางพยาธิวิทยา ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตรงกลาง Chamber นำไปผ่านขบวนการ paraffin embedding แล้วตัดชิ้นเนื้อดังกล่าวเป็นแผ่นบาง ลงในสไลด์ เพื่อนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) และอ่านผลโดยพยาธิแพทย์

2. การตรวจสอบหาสารพันธุกรรม HPV ภายในเซลล์ ตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin embedded tissue เป็นแผ่นบาง นำไปทำการตรวจสอบสารพันธุกรรมของ HPV ด้วยวิธี *in situ* hybridization โดยห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาและจุลชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

3. การตรวจการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด เมื่อครบ 14 วันหลังการปลูกถ่ายเซลล์ (Tumor angiogenesis) นำมาทำการตรวจดูการเพิ่มขึ้นของหลอดเลือด โดยวิธี Intravital Fluorescein Videomicroscopy และใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ภาพ Digital Image Analysis

8. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด gamma delta T lymphocytes

ทำการเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T cell ที่มีคุณสมบัติเป็น gamma delta T lymphocytes โดยใช้ตัวอย่างเลือด buffy coat ที่แยกได้จากผู้บริจาคโลหิตที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งเซลล์ชนิดนี้มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์แปลกปลอมของร่างกายโดยไม่ต้องอาศัย Major histocompatibility complex (MHC) วิธีทำโดยย่อคือ ทำการแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) จาก buffy coat โดยผ่าน Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation หลังจากนั้นนำ PBMC มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (PAA, Austria) ที่มี 2 mM L-glutamine ยาปฏิชีวนะ 10 mM HEPES และ 10% fetal bovine serum (PAA, Austria) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ และทำการกระตุ้นเซลล์ด้วย 10uM pamidronate (Novartis) 1 ครั้ง และตามด้วย 100u/ml of IL-2 (PeproTech, USA) ทุก 3 วัน เมื่อครบ 14 วัน จึงทำการแยก gamma delta T lymphocytes จาก PBMC โดยใช้ miniMACS (Miltenyi Biotech, Germany) และ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry

9. การทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยเซลล์ gamma delta T lymphocytes ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

9.1 Cytotoxicity test นำเซลล์ gamma delta T lymphocytes ที่เตรียมให้บริสุทธิ์แล้ว มาทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งปากมดลูกในหลอดทดลอง การทดสอบใช้ชุดทดสอบ LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche) ในเบื้องต้นได้ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งปากมดลูก 3 ชนิด คือ HeLa cell, SiHa cell และ Caski cell และใช้ NTY cell ซึ่งเป็น normal

human fibroblast ที่แยกได้จากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก เป็นเซลล์ควบคุม โดยทำการแบ่งเซลล์มะเร็ง ทั้งหมดออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้รับความ pamidronate และ กลุ่ม 2 ไม่ได้ได้รับความ pamidronate โดยใช้อัตราส่วนของ effectors: target cells ที่ 20:1 และ 40:1 ตามลำดับ

9.2 **Cytokine detection** ทำการทดสอบกลไกการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยการวิเคราะห์ ตรวจหา Cytokines ที่หลั่งออกมาในระหว่างการฆ่าเซลล์ ได้แก่ Interferon-gamma, Tumor necrotic factor -alpha ด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป ของ PeproTech, USA

10. การทดสอบความสามารถในการทำลายเซลล์มะเร็งด้วยเซลล์ **gamma delta T lymphocytes** ใน หนูทดลอง (*in vivo*)

10.1 **ทดสอบการคงอยู่ของเซลล์ gamma delta T lymphocytes** ทำการติดฉลากสีเซลล์ gamma delta T lymphocytes ด้วยน้ำยา CellTracker green (5-chloromethyl fluorescein diacetate; CMFDA, Invitrogen, USA) แล้วนำเซลล์ที่ติดฉลากฉีดเข้าสู่บริเวณที่มีการปลูกเซลล์มะเร็งในหนู โดยฉีดหลาย ๆ ตำแหน่ง ทำการตรวจสอบความคงอยู่ของเซลล์ด้วย *in vivo* imaging System (Kodak, USA) ทันทีหลังฉีด

10.2 ***in situ* apoptosis detection** คือ การทดสอบความสามารถของ gamma delta T lymphocytes ในการทำให้เซลล์มะเร็งตาย โดยตรวจดูพยาธิสภาพของเซลล์มะเร็งหลังการยอมสี่ จำเพาะด้วยวิธี *in situ* apoptosis detection kit (ApopTag® Plus Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit; CHEMICON International, USA) ผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

11. การเตรียมโปรตีน E6 และ L1 ของไวรัสแปปิโลมาในหลอดทดลอง

11.1 **การเตรียม E6 และ L1 expression plasmid** พลาสมิด pGEX-4T-2-L1 มียีนสร้าง โปรตีน HPV type 16 L1/GST fusion และ pGEX-3X-E6MT มียีนสร้างโปรตีน HPV type 16 E6/GST fusion ได้รับความอนุเคราะห์จาก Assistant Professor Dr Peter C Angeletti (Nebraska Center for Virology, School of Biological Sciences, University of Nebraska Lincoln, NE 68588, USA) ทำการโคลนพลาสมิดทั้งสองชนิดเข้า *Escherichia coli* DH5 α เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิด ให้เพียงพอ

11.2 **การตรวจสอบยีน E6 และ L1 ใน plasmid** ทำการตรวจสอบยืนยันว่า E6 และ L1 พลาสมิดที่อยู่ใน *Escherichia coli* DH5 α จริง ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers จำเพาะต่อ HPV-16 E6 และ L1 ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 primers ที่ใช้ในการตรวจสอบพลาสมิด E6 และ L1

Primers	Sequence (5'-3')	Target	PCR product (bp)
L1C1	CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT	L1	250
L1C2	TACCCTAAATACTCTGTATTG		
Pr1	TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA	HPV-16 E6	119
Pr2	CGTGTTCTTGATGATCTGCAA		

ทำการเพิ่มปริมาณ DNA 5 ไมโครลิตร ใน 1X PCR buffer (100 mM KCl, 20mM Tris pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 20 pmole of each Pr1/Pr2 primer, 1 unit of Taq polymerase (Fermentas, EU) ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ที่สภาวะ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 35 รอบ และสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที สังเกตผลผลิตที่ได้โดย 1.5% agarose gel ใน 0.5X Tris borate EDTA (TBE) buffer

11.3 การทำ transformation นำพลาสมิดที่เตรียมไว้ transform เข้าสู่ *Escherichia coli* BL-21 (DE3) ซึ่งเป็น expression vector สามารถถูกกระตุ้นด้วย Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Z-competent *Escherichia coli* transformation kit & buffer set (Zymobroth™) เมื่อได้แบคทีเรียที่คัดเลือกแล้ว ต้องตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิดด้วยวิธี PCR ที่กล่าวใน 11.2 อีกครั้ง

11.4 สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีน เพื่อให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการมากที่สุด จึงทำการตรวจสอบหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณสารกระตุ้น คือ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 1 mM และระยะเวลาการกระตุ้น ตั้งแต่ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง แบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นนำไปล้างด้วย PBS และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการสกัดต่อไป

11.5 การสกัดโปรตีน นำแบคทีเรียที่ผ่านการกระตุ้นมาละลาย ทำให้เซลล์แตกโดยเติม PBS ที่มีส่วนผสมของ 2 mM DTT, 1% Triton X-100, lysozyme (1KU/ml), complete proteases inhibitor cocktail (1 tablet/10ml) (Roche Co., USA) และเพื่อให้เซลล์แตกสมบูรณ์ นำไปผ่านเครื่องสั่นคลื่นเสียงสูง (High intensity ultrasonic processor VC505, SONICS) หลังจากนั้นนำไป

ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 17,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บตัวอย่างสารละลายและตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยวิธี SDS-PAGE

11.6 การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

11.6.1 **โปรตีน E6** ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยตัวกรอง (Affinity chromatography) GST Fusion protein column purification kit ของบริษัท GE Healthcare เนื่องจากโปรตีนจาก plasmid vector (pGEX) ถูกเชื่อมอยู่กับ glutathione S-transferase (GST) เมื่อนำมาผ่านตัวกรองที่มี glutathione จับเกาะอยู่กับเจล (sepharose) โปรตีนจะถูกล้าง โปรตีนที่ไม่มี GST จะไหลออกไปกับ buffer จากนั้นเติม elution buffer จะทำให้ GST หลุดออกมาโปรตีนที่เชื่อมอยู่กับ GST จะหลุดออกด้วยทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์มาก

11.6.2 **โปรตีน L1** เนื่องจากโปรตีน L1 อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (Inclusion body) จึงต้องทำให้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำก่อนโดยใช้ 3.5 M urea และกำจัด urea ออกโดยการทำให้ Dialysis ด้วย dialysis membrane ขนาด 7000 ดาลตัน (โปรตีน L1 มีขนาด 8000 ดาลตัน) แล้วจึงนำผ่านตัวกรอง (Affinity chromatography) GST Fusion protein column purification kit ของบริษัท GE Healthcare เพื่อแยกโปรตีนบริสุทธิ์ต่อไป

11.7 **การทำ SDS-PAGE และ Western Blot** เพื่อตรวจสอบยืนยันความบริสุทธิ์ของโปรตีน E6 และ L1 นำโปรตีนที่เตรียมได้มาแยกผ่าน 10% polyacrylamide gel และย้อมดูแถบโปรตีนด้วยสี Coomassie blue สังเกตขนาดของแถบโปรตีนที่ปรากฏ เพื่อให้มีความจำเพาะหลังจากแยกโปรตีนผ่าน 10% polyacrylamide gel แล้วให้ทำการเคลื่อนย้ายโปรตีนมายังแผ่นเมมเบรน (nitrocellulose membrane) และทำการตรวจหาโปรตีนด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่อ E6 และ L1 [mouse anti-HPV-16 L1 and E6 monoclonal antibody(Santa cruz)] และ goat anti-mouse IgG labeled alkaline phosphatase (Santa cruz) ตามด้วย substrate BCIP/NBT เพื่อสังเกตการปรากฏของแถบสีจำเพาะ

12. การพัฒนาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของโปรตีน E6 ของไวรัสแปปิโลมา

12.1 **เซลล์เพาะเลี้ยง** เซลล์ RKO (ATCC CRL-2577) เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งยังคงมีคุณสมบัติของ wild-type p53 แต่ไม่มี endogenous human thyroid receptor nuclear receptor (h-TRbeta1) ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Minimal Essential Medium (MEM) ที่มี 20% fetal

bovine serum (PAA; Austria), 100 units/ml penicillin G และ 100 µg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine and 0.01M HEPES (N-2-hydroxyethylpiperaine-N'-2-ethan sulfonic acid) (Sigma, USA) เซลล์เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% CO₂

12.2 Plasmid pCI-Neo (Promega, USA) ที่มียีน HPV-16 E6 ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Paul Harmonat, University of Arkansas, USA นำพลาสมิดมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน HPV-16 E6 ด้วยวิธี PCR ในข้อ 11.2

12.3 การทำ Transfection นำพลาสมิด pCI-Neo มาเข้าสู่เซลล์ RKO โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป FUGENE HD® Transfection kit (Roche, USA) และวิธีการตามที่บริษัทแนะนำ ทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีพลาสมิด pCI-Neo โดยใช้ยาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml ผสมเข้าไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ต่อไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 3 วัน ประมาณ 1 เดือน หลังจากนั้น นำเซลล์ที่เลี้ยงได้มาตรวจสอบการมียีน HPV-16 E6 ด้วยวิธี PCR ในข้อ 11.2 เซลล์ที่มียีน HPV-16 E6 ที่ต้องการต่อไปเรียกว่า RKO-E6

12.4 การตรวจสอบ RKO-E6 ด้วยวิธี Immunofluorescence นำเซลล์ RKO-E6 ที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ โดยนำเซลล์มาตรึงบนสไลด์ด้วย cold acetone ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้อมด้วย mouse monoclonal anti-HPV16 E6/18 E6 IgG (Santa cruz) ที่ความเจือจาง 1:100 ตามด้วย goat polyclonal anti-mouse IgG PE (Abcam, UK) ความเจือจาง 1:20 ครั้งละ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (Olympus, USA) สังเกตเซลล์ที่มีการเรืองแสงสีแดง

12.5 RKO-E6 Stable cell line เพื่อต้องการเซลล์ที่มีคุณสมบัติการแสดงออกของโปรตีน HPV-16 E6 ให้อยู่ตลอดเวลา จึงต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ RKO-E6 ที่ได้จากข้อ 12.3 ต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกโดยใช้ยาปฏิชีวนะ neomycin 2,000 µg/ml เป็นระยะทุก ๆ 2 เดือน ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์เป็นระยะๆ จนกระทั่งเซลล์ทุกเซลล์มีการแสดงออก (ร้อยละ 100)

12.6 การตรวจสอบ RKO-E6 ด้วยวิธี Western blot นำเซลล์จำนวนสิบล้านเซลล์มาสกัดโปรตีนและแยกผ่าน SDS-PAGE และตรวจหา HPV-16E6 ด้วยวิธี Western blot ตามวิธีข้อ 11.7

13. การพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนจำเพาะต่อ HPV ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ

- 13.1 การเตรียมอนุภาคนาโนทองคำ จัดซื้อ gold colloidal solution ขนาด 10 nm จากบริษัท Sigma-Aldrich, cat.G1527 อนุภาคนาโนทองคำนี้มีปริมาณ 0.01% แฉวงลอยใน 0.01% tanic acid, 0.04% trisodium citrate, 0.26 mM potassium carbonate, และ 0.02% sodium azide
- 13.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอนุภาคนาโนทองคำกับแอนติบอดีต่อ HPV เพื่อให้ได้ปริมาณแอนติบอดีที่เคลือบสูงที่สุดบนผิวอนุภาคนาโนทองคำ จึงต้องหาสภาวะที่เหมาะสมของความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลาย (pH 4, 5, 6, 7, 8, และ 9) กับความเข้มข้นของแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPV-16E6 และ HPV-16L1 (Santa cruz) ซึ่งเจือจางเป็น 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 and 1:1000 เมื่อทำปฏิกิริยาแล้วนาน 5 นาที จึงนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 580 nm
- 13.3 การเตรียมอนุภาคนาโนทองคำเคลือบแอนติบอดีต่อ HPV โดยย่อคือ นำสารแฉวงลอยอนุภาคนาโนทองคำปรับสภาวะกรด-ด่างด้วย 0.2 M K_2CO_3 ให้ได้ pH 8.0 ใส่แอนติบอดีปริมาณ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม จึงทำการล้างอนุภาคนาโนทองคำด้วยสารละลาย 20 mmol/L sodium borate, pH 8 ที่มี 1% BSA และ 0.1% sodium azide ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 25000 รอบต่อนาที และใส่สารละลาย 20 mmol/L sodium borate, pH 8 ที่มี 1% BSA และ 0.1% sodium azide เก็บ 4°C
- 13.4 การตรวจหาแอนติเจน HPV-16 E6 และ HPV-16L1 ด้วยวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ นำโปรตีนบริสุทธิ์ HPV-16 E6 และ HPV-16L1 ที่เตรียมจากข้อ 11.6 มาทำปฏิกิริยากับอนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ HPV ข้อ 13.3 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส และนำมาตรวจปฏิกิริยาด้วยเครื่อง spectrophotometer (SmartTM Spec, BIO-RAD) ที่ความยาวคลื่น 520, 580 และ 620 nm หลังจากทำปฏิกิริยานาน 0, 30 และ 60 นาที โดยหลอดควบคุมบวกใช้เซลล์มะเร็งปากมดลูก CaSki ซึ่งมีสารพันธุกรรมของ HPV-16 อยู่ประมาณ 600 copies และหลอดควบคุมลบ ใช้อนุภาคนาโนทองคำที่เคลือบด้วย normal antibody

13.5 ความจำเพาะและความไวของวิธีการรวมกลุ่มอนุภาคนาโนทองคำ เพื่อหาความไวของการตรวจจึงทำการเจือจางปริมาณแอนติเจนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0.625, 2.5, 10, and 40 $\mu\text{g/ml}$ และทำการทดสอบ ส่วนการหาความจำเพาะใช้ตัวอย่าง cell lysate ของแบคทีเรียซึ่งพบได้บ่อยในช่องคลอด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridians*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* โดยได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างดังกล่าวจาก อาจารย์ ดร.ธนัชฐา ฉัตรสุวรรณ หน่วยแบคทีเรียวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นอกจากนี้ใช้ตัวอย่าง cell lysate ของเซลล์มะเร็งปากมดลูกที่มีและไม่มีสารพันธุกรรมชนิดต่าง ๆ ของ HPV ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Standard cell lines used in control experiment

Cell lines	Type of cell line	HPV DNA
CaSki	Human cervical carcinoma	~ 600 copies HPV-16 DNA
SiHa	Human cervical carcinoma	1-2 copies HPV-16 DNA
Hela	Human cervical carcinoma	HPV-18 DNA
ME-180	Human cervical carcinoma	HPV-39 DNA, HPV-18 DNA
MS751	Human cervical carcinoma	HPV-18 DNA, HPV-45 DNA
C-33A	Human cervical carcinoma	Negative for HPV DNA
HEp-2	Human laryngeal carcinoma	Negative for HPV DNA